

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 814 471

⑳ N° d'enregistrement national : **00 12315**

⑤① Int Cl⁷ : C 12 N 9/00, A 01 N 65/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 27.09.00.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 29.03.02 Bulletin 02/13.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.

⑦② Inventeur(s) : LIENART YVETTE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-
CHY SARL.

⑤④ UTILISATION DE POLYMERES ET D'OLIGOMERES DE XYLOGLUCANE, ET DE COMPOSES DERIVES, EN
TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET BIOFERTILISANTS.

⑤⑦ L'invention a pour objet l'utilisation d'un composé
comprenant une structure osidique de formule:

$$X_1-X_2-X_3-(X_4)_n$$

dans laquelle X_1 , X_2 , X_3 , et X_4 , indépendamment les
uns des autres, représentent un ose choisi parmi le glucose,
le galactose, le xylose, le fucose, ou l'arabinose, cet ose
étant le cas échéant sous forme réduite et/ ou étant substitué,
notamment par un groupe alkyle ou acyle, tel qu'un
groupe méthyle ou acétylé, et n représente 0 ou 1, dans le
cadre de l'adaptation des plantes à un stress abiotique, le
contrôle de la floraison, le contrôle de la fructification, et l'in-
duction de réactions de défense contre les pathogènes.

FR 2 814 471 - A1



UTILISATION DE POLYMERES ET D'OLIGOMERES DE XYLOGLUCANE, ET DE COMPOSES DERIVES, EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET BIOFERTILISANTS

5

La présente invention a pour objet de nouvelles utilisations de polymères ou d'oligomères de xyloglucane, ainsi que de composés dérivés, dans le domaine phytosanitaire, et celui de la biofertilisation.

10

Les parois cellulaires des fruits et des végétaux sont formés de polysaccharides, dont principalement la pectine, la cellulose et le xyloglucane qui intervient dans la mise en place des parois (Levy S et al., Plant J. 1997, 11(3) : 373-86). Le xyloglucane se retrouve également en grande quantité dans l'endosperme des graines des Dicotylédones.

15

20

25

Le xyloglucane est un polymère de 1,4- β -glucane substitué différemment selon son origine. Chez les Dicotylédones, les substitutions des chaînes linéaires de 1,4 β -D-glucane impliquent le plus souvent des ramifications de type 1,6 α -D-xylosyl, ou 1,6 α -D-xylose 1,2 β -D-galactosyl, et du fucose peut être associé, en position terminale, au galactose, soit une ramification latérale de type 1,6 α -D-xylose 1,2 β -D-galactose 1,2 α -L-fucosyl. Toujours chez les Dicotylédones, le résidu fucose est absent de l'endosperme, et il peut être remplacé par le résidu α -L-arabinose, par exemple chez certaines Solanacées. Le xyloglucane des Monocotylédones diffère de celui des Dicotylédones par un taux plus faible de substitution par les résidus xylose, galactose et par l'absence de fucose. Le xyloglucane forme avec les microfibrilles de cellulose des structures pontées qui constituent l'ossature et assurent la flexibilité de la paroi cellulaire des végétaux (Pauly M, Albersheim P, Darvill A, York WS (1999) Plant J, 20 (6): 629-39).

30

Le xyloglucane est un substrat d'endoxyloglucanases (Vincken JP, Beldman G, Voragen AG Carbohydr Res (1997) 13, 298(4):299-310) ou de xyloglucane endotransglycosylase (Steele NM, Fry SC, Biochem J (1999) 15, 340, 1, 207-211), à savoir d'activités enzymatiques aptes à modifier la structure des parois cellulaires au cours de l'élongation cellulaire, en période de germination, de fructification par exemple et qui sont dépendantes d'hormones notamment d'auxines (Hetherington PR et Fry S.

(1993) *Plant Physiology*, 103, 987-992), et de gibbérellines (MacLachlan G et Brady C (1994) *Plant Physiol* 105, 965-974).

Le xyloglucane, en particulier un oligomère fucosylé, le nonasaccharide XXFG (décrit dans Fry et al. (1993) *Physiologia Plantarum*, 89, 1-3), est bien connu pour son effet antiauxinique (Mac Dougall CJ et Fry SC (1989) *Plant Physiol* 89, 883-887). A l'opposé, des oligomères sans fucose mais avec du galactose comme les oligomères XXLG et XLLG ont un effet auxinique (Mc Dougall GJ et Fry SC (1990) *Plant Physiology* 93, 1042-1048).

Par ailleurs, de nombreux signaux génèrent des espèces activées d'oxygène (on parle également de "burst oxydatif"). Des espèces activées d'oxygène sont bien connues pour être libérées au cours des interactions plante-pathogène. Des oligosaccharides de diverse origine (acide polygalacturonique, chitosane, O-glycanes ..) ont été répertoriés pour leur capacité à générer un burst oxydatif (Low PS et Heinsteins PF (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 472-479; Rogers KR., Albert F, et Anderson AJ (1988) *Plant Physiol* 86, 547-553; Apostol I, Heinsteins PF et Low PS (1989) *Plant Physiol* 90, 109-116; Vera-Estrella R, Blumwald E et Higgins VJ (1992) *Plant Physiol.* 1208-1215; Bolwell GP, Butt VS, Davies DR et Zimmerlin A. (1995) *Free Rad. Res. Comm.* 23, 517-532 ; Orozco-Cardenas M et Ryan CA (1999) *PNAS*, 25, 96, 11, 6553-655; Nita-Lazar M, Iwahara S, Takegawa K, Liénart Y (2000) *J Plant Physiol*, 156, 306-311). Les enzymes NAD(P)H oxydo-reductases pour la libération d'anion superoxyde (Van Gestelen PV, Asard A, Caubergs RJ (1997) *Plant Physiol* 115, 543-550) et peroxydases pour la formation de peroxyde ou d'anion superoxyde ou de radicaux $\cdot\text{OH}$, sont impliquées (Baker CJ et Orlandi EW (1995) *Ann. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321; Chen SX et Schopfer P (1999) *Eur Biochem* 260, 726- 735). D'autres signaux (acide salicylique, jasmonates, cGMP, NO...) génèrent aussi un burst (Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DF (1995) *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 4134-4137; Voros K, Feussner I, Kuhn H, Lee J, Graner A, Lobler M, Parthier B, Wasternack C *Eur J Biochem* (1998) 15, 251, 36-44; Durner J, et Klessig J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10328-10333; Durner D et Klessig DF (1999) *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 369-374).

Des conditions extrêmes d'environnement (sécheresse, froid, UV, salinité...) déclenchent le même effet.

Le rôle majeur de H_2O_2 dans la génération du burst comme dans la régulation du stress oxydant repose :

- sur sa formation par dismutation à partir de l'anion superoxyde (Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK et Murphy TM (1998) *Plant Physiol* 116, 1379-1385),

- sur son utilisation dans des séquences du métabolisme des acides gras C_{18} (pour la peroxydation de lipides (Koch E, Meier BM, Eiben H-G, Slusarenko A (1992) *Plant Physiol* 99, 571-576) ou pour la synthèse d'octadécanoïdes et de leurs dérivés dont certains comme les méthyl-jasmonates sont des métabolites à fonction hormonale,

- sur sa fonction de substrat pour des enzyme peroxydase et catalase, propriété limitant l'accumulation de peroxyde toxique pour la cellule (Baker CJ, Harmon GL, Glazener JA et Orlandi EW (1995) *Plant Physiol*, 108, 353-359).

Les espèces activées d'oxygène, l'anion superoxyde en particulier, contrôlent différentes voies métaboliques. Elles interviennent dans :

- la biosynthèse des polyamines : des monoamines sont oxydées en aldéhydes avec production de NH_3 et de peroxyde. L'oxydation de la L-arginine par la nitrite-synthase aboutit à la formation d'un précurseur de polyamine (L-citrulline),

- la synthèse de l'éthylène,

- la synthèse des gibbérellines. Plus de 20 oxydases sont impliquées dans la régulation de la biosynthèse des gibbérellines.

Les espèces activées d'oxygène interviennent dans des étapes de transduction de signaux, parce qu'elles sont associées à l'activité de liaison de récepteurs ou à l'activité d'enzymes de transduction (Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K et Scheel D (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 29, 94, 9, 4800-4805; Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10328-10333).

Elles interviennent dans la régulation du potentiel redox cellulaire par l'intermédiaire des groupements thiols (conversion GSSG-GSH, cystine-cystéine, etc.). A ce titre, elles contrôlent des processus de sénescence qui se manifestent à certaines phases de la floraison et de fructification dans différents organes.

Le burst oxydatif interfère avec le métabolisme hormonal, le potentiel le plus performant pour réguler les stades de floraison et de fructification (en particulier leur déclenchement et leur durée sont programmés par une balance hormonale (rapport auxine/cytokinine par exemple), et les espèces activées d'oxygène, dont le peroxyde, contrôlent la synthèse des polyamines).

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que les polymères et oligomères de xyloglucane, ainsi que des composés dérivés de ces derniers, ont un effet de stimulation de l'enzyme glutathion réductase, de l'enzyme phospholipase D chez les plantes, ainsi que des glycosylhydrolases.

En stimulant l'enzyme glutathion réductase, les polymères et oligomères de xyloglucane déclenchent des réactions d'adaptation à tout stress oxydant, comme le froid en particulier, en limitant les effets toxiques des espèces activées d'oxygène (Allen RD, Webb RP, Schake SA (1997) Free Radic Biol Med, 23 (3):473-479; O'Kane D, Gill V, Boyd P, Burdon R (1996) Planta, 198 (3):371-377), et ils régulent le potentiel redox de la cellule, ce qui modifie l'activité d'enzymes ou de protéines thiol-dépendantes, phospholipase D, thiol-protéases et inhibiteurs de thiol-protéases en particulier (Taher MM, Mahgoub MA, Abd-Elfattah (1998) AS Biochem Mol Biol Int 46 3, 619-28), ainsi que par un effet d'induction d'un inhibiteur de protéase thiol-dépendante, et ce sans pour autant activer en cascade d'autres systèmes enzymatiques dans des proportions néfastes pour la plante.

En stimulant l'activité phospholipase D, les polymères et oligomères de xyloglucane amplifient l'effet hormonal de l'acide abscissique dans la mesure où l'activation de l'enzyme conduit à la production d'acide phosphatidique (qui mime les effets de l'acide abscissique). A ce titre, ils peuvent révéler un antagonisme contre les gibberellines, l'éthylène ou les jasmonates (Grill E., Himmelbach A. (1998) Current Opinion in Plant Biology, 1, 1, 5, 412-418; Ritchie S, Gilroy S (1998) Plant Biology, 95, 5, 3, 2697-2702; Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M (1997) Plant Cell 9 12, 2243-59).

Actuellement, en dehors des engrais chimiques, le contrôle du développement des végétaux repose principalement sur :

- l'utilisation de compositions agricoles enrichies en oligo-éléments, en composants nitrate, phosphate, et potassium, en polyamines ou en certaines hormones,
- l'utilisation de micro-organismes, naturels ou génétiquement modifiés, qui améliorent la qualité du sol, favorisent la croissance des végétaux ou accroissent le rendement des cultures ; il s'agit notamment des rhizobiacées comme *R. meliloti* et *B. japonicum*, des bactéries fixatrices d'azote libre, comme *Bacillus* et *Pseudomonas*, et des champignons comme *Penicillium*,

- le développement de plantes transgéniques. Cette technologie se heurte à des problèmes législatifs et à une forte opposition de la part des consommateurs; de plus,